



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ³: C12N 9/04, 9/18; C12Q 1/32, 1/44, 1/60</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 82/00333 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. März 1982 (18.03.82)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP81/00139 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. August 1981 (26.08.81) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 30 32 377.4 (32) Prioritätsdatum: 28. August 1980 (28.08.80) (33) Prioritätsland: DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAT- TELLE-INSTITUT e.V. [DE/DE]; Am Römerhof 35, D-6000 Frankfurt/Main 90 (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BETZ, Joachim DE/ DE; Hohe Stätte 16, D-6000 Frankfurt/Main 56 (DE). (74) Anwalt: BLUM, Klaus-Dieter; Batelle-Institut Am Rö- merhof 35, D-6000 Frankfurt/Main 90 (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), CH (eu- ropäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (eu- ropäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht</i></p>

(54) Title: METHOD FOR THE DETERMINATION OF TOTAL CHOLESTEROL

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON GESAMTCHOLESTERIN

(57) Abstract

For the determination of total cholesterol, including bound cholesterol, the bound cholesterol is released by means of cholesterol-esterase and free cholesterol is brought in contact with a cholesterol-hydrogenase obtained from streptomyces hydrogenans, depending on NAD or NADP, and then the reduced co-substrate is measured.

(57) Zusammenfassung

In einem Verfahren zur Bestimmung von Gesamtcholesterin einschließlich des gebundenen Cholesterins wird das ge-
bundene Cholesterin mit Cholesterinesterase freigesetzt und das freie Cholesterin mit einer NAD- oder NADP-abhängigen,
aus Streptomyces hydrogenans gewonnenen Cholesterindehydrogenase umgesetzt und das reduzierte Cosubstrat gemessen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	KP	Demokratische Volksrepublik Korea
AU	Australien	LI	Liechtenstein
BR	Brasilien	LU	Luxemburg
CF	Zentrale Afrikanische Republik	MC	Monaco
CG	Kongo	MG	Madagaskar
CH	Schweiz	MW	Malawi
CM	Kamerun	NL	Niederlande
DE	Deutschland, Bundesrepublik	NO	Norwegen
DK	Dänemark	RO	Rumania
FI	Finnland	SE	Schweden
FR	Frankreich	SN	Senegal
GA	Gabun	SU	Soviet Union
GB	Vereinigtes Königreich	TD	Tschad
HU	Ungarn	TG	Togo
JP	Japan	US	Vereinigte Staaten von Amerika

Verfahren zur Bestimmung von Gesamtcholesterin

- Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Gesamtcholesterin einschließlich des gebundenen Cholesterins durch Freisetzung des gebundenen Cholesterins mit Cholesterinesterase und Umsetzung des freien Cholesterins mit einer NAD- oder NADP-abhängigen Cholesterindehydrogenase und Messung des reduzierten Cosubstrats.
- 20 Bei der üblichen Cholesterinbestimmung nach der Liebermann-Burchard-Reaktion bildet Cholesterin mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure blau-grün gefärbte Verbindungen, deren Farbtintensität gemessen wird. Wegen stark korrodierenden und viskosen Reagenzien eignet sich
- 25 diese Reaktion nicht für die Automatisierung. Sie ist überdies nicht völlig spezifisch, sondern spricht auch auf

andere Steroide, z. B. 3 % Dihydrocholesterol und 0,5 - 1,4 % Δ^7 -Cholestenol an, die ebenfalls in Körperflüssigkeiten vorliegen können.

Zur Bestimmung von Gesamtcholesterin wird im allgemeinen das gebundene Cholesterin mit Cholesterinesterase freigesetzt und das freie Cholesterin mit einem für Cholesterin spezifischen Enzym umgesetzt. Als Cholesterin umsetzendes Enzym wird Cholesterinoxidase genannt, welche in Anwesenheit von Luftsauerstoff Cholesterin unter Bildung von H_2O_2 in Cholestenon überführt (DE-AS 22 24 132; DE-OS 22 65 121; DE-OS 22 65 122).

Der besondere Vorteil dieses Verfahrens ist darin zu sehen, daß eine vollenzymatische Bestimmung des Cholesterins in biologischem Material ermöglicht wird, wo Cholesterin gewöhnlich sowohl in freier als auch in gebundener Form als Ester vorliegt. Durch diese vollenzymatische Bestimmung wird die früher übliche, mindestens zweistufige Methode, bei der die Verseifung des Esters in einer gesonderten Stufe durchgeführt werden muß, wesentlich vereinfacht.

Die Reaktionsprodukte aus der Oxidation des Cholesterins lassen sich nach verschiedenen Methoden bestimmen. Ein bekanntes Verfahren zur Bestimmung von H_2O_2 basiert auf der oxidativen Kupplung mit p-Amino-phenazon und Phenol, in

Gegenwart von Peroxidase. Bei dieser Reaktion wird ein Chromogen gebildet mit einem Absorptionsmaximum bei 500 nm, welches sich leicht mit einem Photometer quantitativ bestimmen läßt. Diese Methode kann zur Cholesterinbestimmung mit Cholesterinoxidase herangezogen werden. Dabei wird
5 Cholesterin mit einfachen Mitteln bestimmt. In vielen Fällen werden jedoch starke Abweichungen festgestellt, die auf eine Trübungsbildung zurückzuführen sind. Ferner sind an dieser Reaktion mindestens zwei Enzyme beteiligt, woraus Fehlermöglichkeiten resultieren können.

10

Bei analytischen und klinischen Bestimmungen wird sehr häufig von Methoden Gebrauch gemacht, die in gekoppelten Reaktionen schließlich zur Reduktion von NAD oder NADP unter Bildung von NADH bzw. NADPH führen, da sich letztere Umsetzung be-
15 sonders einfach in üblichen und weit verbreiteten Photometern verfolgen läßt.

Die bekannten vollenzymatischen Cholesterinbestimmungen lassen sich jedoch nur auf recht komplizierte und umständliche Weise
20 mit den nachgeschalteten enzymatischen Reaktionen koppeln, daß schließlich NADH bzw. NADPH gemessen werden kann. Es ist bekannt, daß diese Schwierigkeit durch ein Verfahren beseitigt werden kann, bei dem das gebundene Cholesterin mit einer Cholesterinesterase freigesetzt und gleichzeitig oder an-
25 schließlich das freigesetzte Cholesterin mit einer NAD- bzw. NADP-abhängigen Dehydrogenase aus einem anaeroben Mikroorga-

nismus oder aus Warmblüterleber bestimmt wird (DE-OS 26 49 249). Der wesentliche Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, daß zur Gewinnung der Cholesterindehydrogenase schwierige Kulturbedingungen eingehalten werden müssen.

- 5 Es ist bekannt, daß aus *Nocardia erythropolis* ein Enzympräparat mit Cholesterindehydrogenase-Aktivität gewonnen werden kann (DE-OS 23 05 232). *Nocardia erythropolis* ist ein aerober Mikroorganismus, besitzt jedoch keine NAD- bzw. NADP-Abhängigkeit. Aus diesem Grunde ist der Nachweis
10 der gebildeten Reaktionsprodukte schwierig und störanfällig.

Der vorliegenden Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mit dem die Nachteile bekannter Verfahren vermieden werden können.

15

- Es hat sich gezeigt, daß sich diese Aufgabe in technisch fortschrittlicher Weise lösen läßt, wenn die Cholesterindehydrogenase aus *Streptomyces hydrogenans* (ATCC 19631) gewonnen wird. Zur Freisetzung des gebundenen Cholesterins
20 kann auch eine Cholesterinesterase aus dem gleichen Mikroorganismus verwendet werden.

- Da *Streptomyces hydrogenans* als ein aerober Mikroorganismus eine Kultivierung in offenen Fermenten zuläßt, werden die Be-
25 dingungen bei der Gewinnung der Cholesterindehydrogenase wesentlich erleichtert. Darüber hinaus ist die aus Strepto-

myces hydrogenans erhaltene Cholesterindehydrogenase NAD- bzw. NADP-abhängig, so daß die Nachteile bekannter Methoden bei der Durchführung des Nachweises vermieden werden können.

- 5 Im folgenden wird die Herstellung der Cholesterindehydrogenase anhand eines lediglich einen Ausführungsweg darstellenden Beispiels näher erläutert.

Für die Kultivierung des Mikroorganismus wird Streptomyces
10 hydrogenans (ATCC 19631) auf Haferflockenagar in Schrägagar-
röhrchen gehalten. Zusammensetzung des Nährbodens nach Heinz
und Ring: 3 g Haferflocken, 2 g Agar, 250 mg NaCl, 90 ml
Wasser und 10 ml Erdextrakt. Das Gemisch wird 30 min im
siedenden Wasserbad erhitzt, über Gaze abgegossen, auf
15 pH 7,2 eingestellt und 5 min bei 177 °C im Autoklaven steri-
lisiert. In Abständen von ca. 6 Wochen wird überimpft und
jeweils nach 10 Tagen bei 30 °C im Brutschrank kann die aus-
gewachsene Stammkultur bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

- 20 Für die Versuche werden Bakterien in Schüttelkulturen von
150 ml bzw. 30 ml Nährmedium in 1 l bzw. 250 ml Erlenmeyer-
kolben kultiviert. Das Medium wird wie folgt hergestellt:
10 g Glucose, 1 g Hefeextrakt, 2,5 g NaCl, 4 g Fleischextrakt,
4 g Caseinpepton und 1 l Wasser werden erhitzt bis sich alle
25 Bestandteile gelöst haben. Nach Filtration wird auf pH 7,5
eingestellt und bei 20 min 117 °C im Autoklaven erhitzt.

Vom Schrägagar wird mit einer Platinöse angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln mit ca. 100 Upm und 7 cm Amplitude eine Übernachtskultur gezüchtet. Diese Kultur kann entweder sofort verwendet werden, oder man impft mit je 20 ml Übernachtskultur eine neue 150-ml-Kultur an, die man nach 5 bis 6 Stunden Wachstum ernten kann. Die Zellen in der quasi-
5 logarithmischen Phase werden in einer Porzellanfilternuschel abgesaugt und mit kaltem Trispuffer (10 mM Tris, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM Natriumazid, pH 7,4) gewaschen. In Fällen, in denen die Zellen schon stark sporulieren und die Filterporen verstopfen, werden sie dreimal in einer Christ-
10 IIK-Zentrifuge bei 1500 x g jeweils 10 min zentrifugiert und gewaschen. Die Zellen werden dann in einem geeigneten Puffer resuspendiert und homogenisiert.

Zum Aufbrechen der Zellwände haben sich vor allem zwei Methoden
15 bewährt: Ultraschallaufschluß und Aufschluß mit der X-Press. Bei der Ultraschallmethode werden die Zellen in 3 ml Tris-Pulver resuspendiert und im Branson-Sonifier S 75 bis 90 sec bei Stufe 8 und 4,5 A homogenisiert. Wenn ein Detergens verwendet werden soll, setzt man es kurz vor Ende der Ultra-
20 schallbehandlung zu. Während der Beschallung wird die Probe mit Eis gekühlt. Zur Aufarbeitung der gesammelten Zellen in der X-Press werden diese in wenig entsprechendem Puffer je nach Extraktionsmethode und gegebenenfalls unter Zusatz von Detergenzien suspendiert und die tiefgekühlte, mindestens
25 -25 °C kalte X-Press eingefüllt und noch eine halbe Stunde bei -30 °C gekühlt. Die gefrorenen Zellen werden dann mittels

einer hydraulischen Presse in vier Durchläufen bei 1000 - 2000 N/mm² homogenisiert.

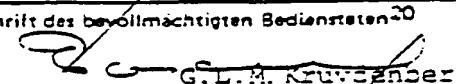
Die homogenisierten Zellen werden 20 min 0 - 4 °C in einer Sorvall Superspeed SR-2 mit 35.000 x g zentrifugiert. Im
5 Niederschlag befinden sich sodann Zellwandtrümmer und Membranteile. Aus dem Überstand können nun durch 3-stündige Zentrifugation bei 105.000 x g und 0 - 4 °C in einer Spinco L50 die Ribosomen sedimentiert werden.

- 10 Die Gewinnung kann durch fraktionierte Ammonsulfatfällung in an sich bekannter Weise erfolgen. Eine weitere Möglichkeit, das Enzym zu höherer spezifischer Aktivität aufzureinigen, besteht in der Ionenaustauscher-Chromatographie. Das gewonnene Enzym kann in Lösung mit dem freien Cholesterin
15 und NAD bzw. NADP als Cosubstrat in an sich bekannter Weise umgesetzt und NADH bzw. NADPH als Endprodukt photometrisch bestimmt werden.

Patentansprüche

- 15 1. Verfahren zur Bestimmung von Gesamtcholesterin einschließlich des gebundenen Cholesterins durch Freisetzung des gebundenen Cholesterins mit Cholesterinesterase und Umsetzung des freien Cholesterins mit
- 20 einer NAD- oder NADP-abhängigen Cholesterindehydrogenase und Messung des reduzierten Cosubstrates, dadurch gekennzeichnet, daß die Cholesterindehydrogenase aus Streptomyces hydrogenans gewonnen wird.

2. Verfahren nach Anspruch, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Freisetzung des gebundenen Cholesterin verwendete Cholesterinesterase aus *Streptomyces hydrogenans* gewonnen wird.

I. KLASSIFIZIERUNG DES MELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben) ²						
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder sowohl nach der nationalen Klassifikation als auch nach der IPC Int.Cl. ³ : C 12 N 9/04; C 12 N 9/18; C 12 Q 1/32; C 12 Q 1/44; C 12 Q 1/60						
II. RECHERCHIERTES SACHGEBIETE						
Recherchiertes Mindestprüfstoff ⁴						
Klassifikationssystem	Klassifikations Symbole					
Int.Cl. ³	C 12 N 9/04; C 12 N 9/18; C 12 Q 1/32; C 12 Q 1/44; C 12 Q 1/60; C 12 Q 1/00					
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁵						
III. ALS BEDEUTSAM ANZUSEHENDE VERÖFFENTLICHUNGEN ¹⁴						
Art +	Kennzeichnung der Veröffentlichung, ¹⁶ mit Angabe, soweit erforderlich, der in Betracht kommenden Teile ¹⁷				Betr. Anspruch Nr. 18	
X	Chemical Abstracts, Band 91, No. 19, 5. November 1979, (Columbus Ohio, US) H. Duchmann u.a. "Purification and characterization of a 3,17-β-hydroxysteroid dehydrogenase from Streptomyces hydrogenans", siehe Seite 250, Zusammenfassung 153358b, Z. Naturforsch. C: Biosci. 1979, 34 C(7-8), 533-40				1	
	-- Chemical Abstracts, Band 83, No.7, 18. August 1975 (Columbus Ohio, US) B. Kohler u.a. "Δ ⁵ -3 β-hydroxysteroid dehydrogenase from streptomyces hydrogenans", siehe Seite 200, Zusammenfassung 55098g, Naturwissenschaften 1975, 62(6), 299.				1	
	-- FR, E, 2369564, veröffentlicht am 26. Mai 1978, siehe Seite 2, Zeilen 3-11, 19-38; Seite 3, Zeilen 1-30; Seite 5, Zeilen 27-32; Patentansprüche 1,2,6, Boehringer in der Anmeldung angeführt ./.				1,2	
+ Besondere Arten von angegebenen Veröffentlichungen: ¹⁵						
"A"	Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert				"P"	Veröffentlichung, die vor dem Anmeldedatum, aber am oder nach dem beanspruchten Prioritätsdatum erschienen ist
"E"	frühere Veröffentlichung, die erst am oder nach dem Anmeldedatum erschienen ist				"T"	Spätere Veröffentlichung die am oder nach dem Anmeldedatum erschienen ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben wurde
"L"	Veröffentlichung, die aus anderen als den bei den übrigen Arten genannten Gründen angegeben ist				"X"	Veröffentlichung von besonderer Bedeutung
"O"	Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht					
IV. BESCHEINIGUNG						
Datum des tatsächlichen Abschlusses der Internationalen Recherche ²	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts ²					
18. November 1981	27. November 1981					
Internationale Recherchenbehörde ¹ EUROPÄISCHES PATENTAMT	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten ²⁰  G.L.M. Kruseberg					

III. ALS BEDEUTSAM ANZUSEHENDE VERÖFFENTLICHUNGEN (FORTSETZUNG DER ANGABEN VON BLATT 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, 16 mit Angabe, soweit erforderlich, der in Betracht kommenden Teile 17	Betr. Anspruch Nr. 18
	<p>übereinstimmend mit DE, A, 2649749</p> <p>---</p> <p>DE, A, 2305232, veröffentlicht am 22. August 1974, siehe die ganze Anmeldung, Whitehead T. u.a. in der Anmeldung angeführt</p> <p>---</p>	
A	<p>FR, A, 2047147, veröffentlicht am 12. März 1971, siehe Seite 2, Zeilen 33-40; Seite 3, Beispiel 1; Patentansprüche 1,5, Kyowa Hakko Kogyo</p> <p>übereinstimmend mit DE, A, 2021465</p> <p>---</p>	1,2
A	<p>DE, A, 2506712, veröffentlicht am 4. September 1975, siehe Seite 1, Zeilen 1-16; Seite 3, Zeilen 28-33; Seite 4, Zeilen 30-35; Seite 5, Zeilen 1-31; Seite 7, Zeilen 23-28, Boehringer</p> <p>---</p>	1,2
A	<p>Chemical Abstracts, Band 79, No. 19, 12. November 1973, (Columbus Ohio, US) H.H. Flegg "Determination of serum cholesterol by an enzymic method" siehe Seite 139, Zusammenfassung 112935w Ann. Clin. Biochem. 1973, 10 (Pr.3), 79-84</p> <p>-----</p>	1

International Application No PCT/EP 81/00139

International Application No PCT/EP 81/00139

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (October 1977)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

A Chemical Abstracts, vol. 79, No 19, 12 November 1973, (Columbus Ohio, US) H.H. Flegg "Determination of serum cholesterol by an enzymic method" see page 139, abstract 112935w, Ann. Clin. Biochem. 1973, 10 (Pr.3), 79-84

1

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹⁰

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☐ Claim numbers _____, because they relate to subject matter ¹² not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim numbers _____, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out ¹³, specifically:

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ¹¹

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (us, ...)
